



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

**PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA –
PIBIC**

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERAPÊUTICO DO 17-AAG NA INFECÇÃO
IN VITRO POR *Leishmania infantum***

Área do conhecimento: Ciências Biológicas

Subárea do conhecimento: Imunologia

Especialidade do conhecimento: Imunopatologia da Leishmaniose Visceral

Relatório Final

Período da bolsa: de agosto/2017 a julho/2018

Este projeto é desenvolvido com bolsa de iniciação científica
PIBIC/COPES

RESUMO

Leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias causadas por espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. A primeira linha de tratamento da Leishmaniose Visceral (LV), corresponde aos antimoniais, no entanto, estas drogas apresentam limitações, tais como toxicidade, alto custo, duração prolongada e, principalmente, o surgimento de isolados resistentes, destacando-se, assim, a necessidade do desenvolvimento de novos compostos para terapia da LV. Dentre as novas drogas, destaca-se o 17-AAG, cujo poder leishmanicida foi objeto de estudo do plano de trabalho anterior. Neste, objetiva-se avaliar *in vitro* o poder leishmanicida do 17-AAG associado ao antimonial em isolados de *Leishmania infantum* sensíveis e resistentes ao antimonial. Inicialmente, associou-se o IC50 do antimonial trivalente (Sb^{III}) de cada isolado com diferentes concentrações do 17-AAG, demonstrando que menores concentrações do 17-AAG foram necessárias quando comparado ao uso isolado da droga, independente do perfil de resistência do isolado. Em seguida, associou-se diversas concentrações do Sb^{III} a 1uM do 17-AAG, demonstrando uma potencialização na ação do antimonial para induzir a morte do parasito. Por fim, a associação de 1uM do 17-AAG a 10ug/ml do antimonial pentavalente reduziu de forma irreversível a infecção e a carga parasitária em macrófagos humanos infectados. Dessa forma, com base nos experimentos *in vitro*, podemos concluir que o 17-AAG é uma alternativa de droga a ser utilizada no tratamento da LV.

Palavras-chave: Leishmaniose Visceral, HSP-90, 17-AAG, Antimonial, Quimioterapia

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	01
2.	OBJETIVOS	05
2.1.	Objetivo Geral	05
2.2.	Objetivos Específicos	05
3.	METODOLOGIA	06
3.1.	Obtenção e cultura de <i>Leishmania infantum</i>	06
3.2.	Análise da viabilidade de promastigotas refratárias de <i>L. infantum</i> tratados com a associação de diferentes concentrações de 17-AAG associado ao IC50 do antimonial de cada isolado	06
3.3.	Análise da viabilidade de promastigotas refratárias de <i>L. infantum</i> tratados com a associação 1uM de 17-AAG associado a diferentes concentrações do antimonial	07
3.4.	Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)	07
3.5.	Avaliação da viabilidade celular de macrófagos humanos obtidos de PBMC tratados com a associação do 17-AAG ao antimonial	07
3.6.	Avaliação da infecção de macrófagos humanos e da carga parasitária obtidos de PBMC tratados com a associação do 17-AAG ao antimonial	08
3.7.	Avaliação da viabilidade dos parasitos intracelulares após o tratamento com a associação do 17-AAG ao antimonial de macrófagos infectados	08
3.8.	Análise estatística	09
3.9.	Aspectos éticos	09
4.	RESULTADOS	10
4.1.	Associação com o IC50 do antimonial potencializou o poder leishmanicida do 17-AAG em culturas de isolados sensíveis e resistentes ao antimonial	10
4.2.	Associação do 17-AAG ao antimonial altera o perfil de resistência de isolados de <i>L. infantum</i>	11
4.3.	Associação do 17-AAG ao antimonial não apresenta citotoxicidade em macrófagos humanos	14
4.4.	Associação do 17-AAG ao antimonial reduz a taxa de infecção por <i>L. infantum</i> em macrófagos	15
5.	DISCUSSÃO	19

6.	CONCLUSÃO	234
7.	REFERÊNCIAS	245
8.	ATIVIDADES REALIZADAS DE AGOSTO/17 A JULHO/18	2930
9.	OUTRAS ATIVIDADES	304
10.	ANEXOS	312
	10.1. Certificado de apresentação do trabalho no 27º Encontro de Iniciação Científica da UFS	312
	10.2. Certificado de apresentação do trabalho em pôster o III SINDIP - III Simpósio Nordestino de Doenças Infecciosas e Parasitárias	312
	10.3. Certificado de menção honrosa na apresentação do trabalho em pôster o III SINDIP - III Simpósio Nordestino de Doenças Infecciosas e Parasitárias	323

1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causadas por várias espécies de protozoários intracelulares do gênero *Leishmania*. A doença pode apresentar duas formas clínicas: cutânea e visceral. No que diz respeito a forma visceral, o principal agente etiológico no Brasil é a espécie *Leishmania infantum* (Dantas-Torres, 2006).

O parasito é caracterizado como digenético, visto que apresenta uma forma flagelada, promastigota, encontrada no tubo digestivo de insetos do gênero *Lutzomyia*, e uma forma aflagelada, amastigota, encontra nos macrófagos dos hospedeiros mamíferos (Banuls et al., 2007; Handman, 1999). Destes, destacam-se o homem e o cão, considerado como principal reservatório da LV (Zijlstra & El-Hassan, 2011).

A LV humana possui ampla distribuição geográfica, considerada endêmica em diversas regiões do mundo, apresentando cerca de 200.000 – 400.000 casos ao ano e mortalidade de 48.000 (DNDi, 2016). Aproximadamente de 90% dos casos estão concentrados em 6 países: Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão, Sudão do Sul e Brasil (WHO, 2016). O Brasil é o responsável por cerca de 90% dos casos da América Latina, sendo relatado cerca de 3.453 casos, com letalidade de 7% no ano de 2014 (Marcondes; Rossi, 2013; WHO, 2016). A maior parte dos casos se concentra na região Nordeste, principalmente na região rural, embora atualmente a doença esteja em processo de urbanização, atingindo também a zona urbana de outras regiões do país (Maia-Elkhoury et al., 2008). Em Sergipe, entre os anos de 2008 e 2014, foram confirmados 406 casos de LV, sendo 159 destes em Aracaju (Campos et al., 2017).

A doença compromete diversos órgãos internos, especialmente fígado, baço, gânglios linfáticos e medula óssea (Fiocruz, 2013). No entanto, a forma clínica da doença varia de acordo com a cepa infectada e com a situação do sistema imune do hospedeiro (Boakye et al, 2005). Em geral, a LV é caracterizada como uma enfermidade crônica, generalizada caracterizada por febre irregular e de longa duração, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, hipergamaglobulinemia, hipoalbuminemia, pancitopenia e debilidade progressiva, podendo ocasionar a caquexia (Berman, 1997; Stanley; Engwerda, 2006).

Hoje, a primeira linha de tratamento da LV consiste na administração de antimoniais pentavalentes (Sb^{+5}), como o antimoniato de meglumina/Glucantime ou o

estibogluconato de sódio/Pentostam. Os antimoniais interferem no metabolismo oxidativo das formas amastigotas de *Leishmania* ao promover a inibição da glicólise e da oxidação de ácidos graxos, resultando assim numa produção reduzida de ATP e de GTP. Tais drogas também possuem outros mecanismos, como ligação inespecífica aos grupos sulfidrílicos das proteínas das amastigotas (Chulay et al., 1988; Berman, 1997).

A OMS indica o uso de Glucantime na dosagem de 20mg/kg/dia por 20, devendo estender para 30 dias o tratamento caso não aja resposta satisfatória nos primeiros 20 dias. Em caso de recidiva, o mesmo esquema terapêutico deve ser utilizado, embora o período agora deva ser maior, de 40 dias. Se após o segundo ciclo a doença persistir, deve-se lançar mão de esquemas terapêuticos utilizando outras drogas (Brasil, 2006).

O uso de Sb^{+5} , porém, está associado com uma toxicidade significativa, capaz de comprometer coração, pâncreas, rins e fígado. Tais efeitos colaterais, associados a longa duração do esquema terapêutico, favorecem a interrupção do tratamento por diversos pacientes, o que, por sua vez, leva ao desenvolvimento de cepas resistentes as drogas.

Em caso de falha no segundo ciclo de tratamento com Sb^{+5} ou em áreas de cepas resistentes, outras drogas como Anfotericina B (AmB), Miltefosina (MIL) e Paromomicina (PM) são utilizadas no tratamento da LV. No entanto, todas essas drogas apresentam limitações para se tornarem acessíveis e comuns para o tratamento da LV. A AmB lipossomal, embora seja bastante utilizada por apresenta baixa toxicidade e curto período de tratamento, apresenta custo elevado e instabilidade em altas temperaturas. A MIL, comum em casos de cepas resistentes e de uso oral, apresenta efeitos teratogênicos que não podem ser desconsiderados. A PM, além de necessitar 21 injeções via intramuscular, apresenta severa toxicidade em órgãos como rim e fígado (Mishra et al, 2007; Freitas-Junior et al., 2012; Menezes et al., 2015).

Diante do surgimento de cepas resistentes ao tratamento tradicional e a severa toxicidade associada as drogas leishmanicidas atualmente em uso, faz-se urgente a necessidade de desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da LV, que sejam seguras e mais acessíveis que as atuais disponíveis. Novos estudos para o desenvolvimento de drogas para o tratamento de diversas doenças, levam em consideração um novo mecanismo que tem como alvo as proteínas de choque térmico 90 (HSP-90), o que para a leishmaniose se torna um tratamento promissor, tendo em

vista que esta representa cerca de 2,8% das proteínas plasmáticas do parasito (Brandau et al., 1995). A HSP-90 é uma chaperona molecular que atua no enovelamento e na estabilização de um grande número de proteínas, facilitando seu desdobramento e endereçamento correto (Gupta, 1995).

Para realizar sua função, a chaperona apresenta um sitio de ligação ao ATP, que é o alvo de ação de muitas drogas, inibindo assim a ação da proteína, o que leva a ubiquitinação das proteínas clientes e subsequente degradação do proteossoma (Isaacs et al., 2009). Dessa forma, os inibidores do HSP-90 resultam em um menor crescimento do parasito em cultura e em morte por apoptose (Wiesgigl, Clos, 2001; Li et al, 2009). Dentre os principais representantes dessa classe de drogas se encontra a Geldamicina e seus derivados.

A GA é um composto natural derivado da bactéria *Streptomyces hygroscopicus* que embora apresente efeitos leishmanicidas, apresenta baixa solubilidade, limitada estabilidade *in vivo* e hepatotoxicidade. No entanto, um composto semissintético derivado da GA, o 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin-tanespimicina (17-AAG), apresenta menor toxicidade e maior afinidade ao sitio de ligação ao ATP da HSP-90, possuindo, consequentemente, maior poder inibitório (Schulte, Neckers, 1998). O 17-AAG é uma droga utilizada em diversos ensaios clínicos para o tratamento de pacientes com câncer, sendo necessária altas dosagens para que apresente resultado significativo (Jhaveri et al., 2012; Jhaveri et al., 2014). Já no que diz respeito ao tratamento *in vitro* das variadas apresentações clínicas da Leishmaniose, essa droga apresenta eficácia em concentrações muito menores, em nível nanomolar, inclusive contra a LV causada por *L. infantum* e contra a forma cutânea causada por *L. braziliensis*. (Petersen et al, 2012; Santos et al, 2014).

Diante do exposto acima, o 17-AAG apresentou efeito pronunciado contra diversas espécies de *Leishmania*, inclusive contra *L. infantum* responsável pela LV no Brasil. Com o aumento no número de casos refratários ao tratamento, é imperativo o desenvolvimento de estudos que visam testar novas drogas para o tratamento desta doença negligenciada, e que sejam eficazes, inclusive, contra isolados de parasitos resistentes aos tratamentos padrões. Portanto, propomos que o 17-AAG é uma alternativa viável para a quimioterapia da LV causada por isolados resistentes aos tratamentos padrões.

Além do desenvolvimento de novas drogas, é importante observar como se comporta o os parasitos de *L. infantum* frente a associação de drogas, com o objetivo de potencializar o efeito leishmanicida de ambas as drogas, junto a uma redução nos efeitos colaterais associados ao uso isolado das drogas (Olliaro et al., 2010). Na literatura, já se tem descrito a associação de drogas para o tratamento da hanseníase (Pallavai, 2010) e da malária (Meyer & Shapiro, 2013), além da presença de ensaios *in vitro*, inclusive do próprio grupo de pesquisa, que demonstra a associação do antimonial a novas drogas para o tratamento de outras apresentações clínicas de Leishmaniose (Celes et al, 2016).

Nossa hipótese anterior, em que acreditávamos que o 17-AAG possuía atividade leishmanicida contra isolados de *L. infantum* de pacientes refratários foi confirmada no plano de trabalho anterior ainda não publicado. Com base nisso, a nossa nova hipótese é de que a associação do 17-AAG ao antimonial apresente a ação sobre os isolados de *L. infantum* refratários ao tratamento padrão atual.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial da associação do 17-AAG ao antimonial como nova forma de tratamento para a leishmaniose visceral causada por isolados de *Leishmania infantum* naturalmente resistentes ao antimonial.

2.2. Objetivos específicos

- 1) Avaliar a viabilidade celular em macrófagos tratados com associação do 17-AAG ao antimonial;
- 2) Testar a suscetibilidade de isolados de promastigotas de *Leishmania infantum*, resistentes ao antimonial, ao tratamento com a associação do 17-AAG ao antimonial.

3. METODOLOGIA

3.1. Obtenção e cultura de *Leishmania infantum*

Os isolados de *L. infantum* foram obtidos a partir do banco de criopreservação (-70 °C) do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe. Essas amostras foram isoladas de pacientes com LV, participantes do projeto de pesquisa sob coordenação do Dr. Roque Pacheco de Almeida, e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-HU-UFS), código CAAE-0151.0.107.000-07. Selecionamos dois isolados de pacientes refratários ao tratamento e como controle dois isolados de pacientes que responderam ao tratamento. Os pacientes responsivos foram aqueles que apresentaram cura após o primeiro curso de antimônio; os pacientes refratários foram aqueles que não apresentaram cura após dois ou mais cursos de antimônio (Tabela 1).

As promastigotas foram cultivadas a 26 °C, em meio Schneider (Invitrogen) suplementado com 10% de soro fetal bovino, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100ug/mL).

Tabela 1. Perfil dos isolados selecionados.

Isolado	Antimonial (IC ₅₀ µM)	Perfil de resistência	
		SBIII	NO
Isolado 1	150	S	S
Isolado 2	250	S	S
Isolado 3	615	R	S
Isolado 4	805	R	R

(Adaptado de SANTOS et al., 2012; de Moura et al., 2015)

3.2. Análise da viabilidade de promastigotas refratárias de *L. infantum* tratados com a associação de diferentes concentrações de 17-AAG associado ao IC₅₀ do antimonial de cada isolado

Promastigotas em crescimento exponencial foram semeadas em microplacas de 96 poços (Corning) (1x10⁵/ poço) e tratadas com a associação de diferentes concentrações do 17-AAG (250, 500, 750, 1500 e 3000 nM) ao IC₅₀ do antimonial trivalente (SbIII) de cada isolado, definido anteriormente em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa (Tabela 1). Como controle positivo, foram utilizados também um

grupo sem tratamento, um com o DMSO, diluente do 17-AAG, e o valor do IC50 do SbIII de cada isolado. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD por 48 h, quando então o número de parasitos viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer.

3.3. Análise da viabilidade de promastigotas refratárias de *L. Infantum* tratados com a associação 1µm de 17-AAG associado a diferentes concentrações do antimonial

Promastigotas em crescimento exponencial foram semeadas em microplacas de 96 poços (Corning) (1×10^5 / poço) e tratadas com a associação de uma concentração de 1µM do 17-AAG a diversas concentrações do SbIII (25, 75, 150, 225, 300, 500, 750 e 1.000 µM). Como controle positivo, foram utilizados também um grupo sem tratamento, um com o DMSO, diluente do 17-AAG, e o valor do IC50 do SbIII de cada isolado. Em seguida, as placas foram incubadas em estufa BOD por 48 h, quando então o número de parasitos viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer.

Por fim, foi determinado o valor de IC50 do SbIII na associação do 17-AAG ao SbIII como um índice de fenótipo de suscetibilidade dos isolado a associação entre as drogas.

3.4. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC)

Foram obtidos macrófagos humanos a partir de PBMC de 7 (sete) doadores voluntários. Para realização da técnica, coletou-se em tubo 200uL de heparina, 20 mL de sangue do doador. Em seguida, o sangue foi diluído para 40ml em solução salina estéril e, então, realizou-se a separação dos componentes sanguíneos por densidade utilizando-se 3mL de Histopaque (SIGMA). Após coleta, as células polimorfonucleares foram distribuídas em placas de 24 poços na densidade de 4×10^5 células por poço e mantidos em 500ul de meio RPMI-1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de penicilina (100U/mL) e de estreptomicina (100ug/mL) (Invitrogen) por 5 dias para que diferenciassem em macrófagos.

3.5. Avaliação da viabilidade celular de macrófagos humanos obtidos de PBMC tratados com a associação do 17-AAG ao antimonial

No quinto dia de diferenciação, os macrófagos foram tratados de forma isolada com 1 μ M do 17-AAG, 10mg do antimonial pentavalente (Sb⁺⁵) ou com a associação entre as drogas por 24h e então a viabilidade foi avaliada através da contagem diferencial por Trypan Blue considerando 200 células em pelo menos 10 campos randômicos observados em microscópio invertido.

3.6. Avaliação da infecção de macrófagos humanos e da carga parasitária obtidos de PBMC tratados com a associação do 17-AAG ao antimonial

Após o processo de separação, as células polimorfonucleares foram depositas em cima de lamínulas de vidro no fundo de placas de 24 poços e encubadas para diferenciação. No quinto dia, os macrófagos infectados por promastigotas em fase estacionária na proporção de 1:10 e encubadas (37°C, 5% CO₂) novamente pelo período de duas horas. Após este período, as culturas foram tratadas de forma isolada com 1 μ M do 17-AAG, 10mg do antimonial pentavalente (Sb⁺⁵) e com a associação entre as drogas por 24h e então as lamínulas foram lavadas e coradas por hematoxilina e eosina (H&E). O número de células infectadas e de amastigotas por 100 macrófagos foram avaliadas por microscopia ótica por dois investigadores independentes e cegos para o tratamento.

3.7. Avaliação da viabilidade dos parasitos intracelulares após o tratamento com a associação do 17-AAG ao antimonial de macrófagos infectados

Após o processo de separação, as células polimorfonucleares foram depositas no fundo de placas de 24 poços e encubadas para diferenciação. No quinto dia, os macrófagos infectados por promastigotas em fase estacionária na proporção de 1:10 e encubadas (37°C, 5% CO₂) novamente pelo período de duas horas. Após este período, as culturas foram tratadas de forma isolada com 1 μ M do 17-AAG, 10mg do antimonial pentavalente (Sb⁺⁵) e com a associação entre as drogas por 24h. Após este período, o meio RPMI foi trocado pelo meio de cultura Schneider e então as placas foram encubadas em estufa BOD a 24°C. O número de parasitos viáveis foi determinado por contagem direta em câmara de Neubauer nos 5º e 7º dias após a troca do meio de cultura (Protocolo adaptado Santos et al., 2014).

3.8. Análise estatística

Os dados foram apresentados como média \pm erro padrão (EP). O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para análise da normalidade. Para comparação de três ou mais grupos foi utilizado ANOVA com os pós-testes de Dunnett's, linear trend ou Bonferroni (testes paramétricos). Para os dados não paramétricos, as comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney. Todos os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism 5, San Diego, EUA. O cálculo da IC50 em promastigotas foi determinada por regressão sigmoidal das curvas de dose-resposta. Para todas as análises um $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

3.9. Aspectos éticos

Este projeto envolveu pesquisa com isolados obtidos de pacientes com LV refratários ao tratamento. Essas amostras foram isoladas de pacientes com LV, participantes do projeto de pesquisa sob a coordenação do Dr. Roque Pacheco de Almeida, e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP-HU-UFS), código CAAE-0151.0.107.000-07.

4. RESULTADOS

4.1. Associação com o IC50 do antimonial potencializou o poder leishmanicida do 17-AAG em culturas de isolados sensíveis e resistentes ao antimonial

Inicialmente, objetivamos avaliar como se comportam as culturas de *L. infantum* frente a associação das drogas. Para isso, isolados sensíveis e resistentes foram expostos a crescentes concentrações do 17-AAG associado ao IC50 do SbIII de cada isolado, definidos anteriormente pelo grupo de pesquisa.

Nos dois isolados sensíveis ao antimonial testados, observou-se na concentração de 0,25 uM de 17-AAG, a menor utilizada, que a redução da viabilidade já é significativa quando comparado ao grupo controle, reduzindo-se ainda mais conforme se aumenta a concentração do 17-AAG (Figura 1A-B). Quando se compara a viabilidade obtida nessa associação com viabilidade com o tratamento isolado com o 17-AAG, resultado presente no relatório anterior, observou-se uma redução de 87,5% na menor concentração a qual o 17-AAG passa a reduzir de forma significativa a viabilidade parasitária em ambos isolados.

No que diz respeito ao tratamento dos isolados resistentes, o isolado 3, assim como se observou nos isolados sensíveis, apresentou redução significativa da viabilidade parasitária desde a menor concentração utilizada (0,25 uM) do 17-AAG (Figura 1C). Já no isolado 4, só há redução da viabilidade do parasito na concentração de 0,5 uM do 17-AAG (Figura 1D). Ambos isolados, assim como sensíveis, ainda apresentaram redução da viabilidade segundo um efeito dose dependente. Quando comparado ao tratamento isolado com o 17-AAG, relatado no plano de trabalho anterior, observa-se uma redução, respectivamente de 93,75% e 75%, na menor concentração em que o 17-AAG passa a reduzir a viabilidade parasitária.

Dessa forma, podemos observar que tanto os isolados sensíveis quanto os isolados resistentes apresentam comportamento semelhante frente ao tratamento com a associação entre o 17-AAG e o antimonial. Diante disso, é possível sugerir que essa associação possa então, estar interferindo no mecanismo de resistência ao antimonial dos isolados resistentes.

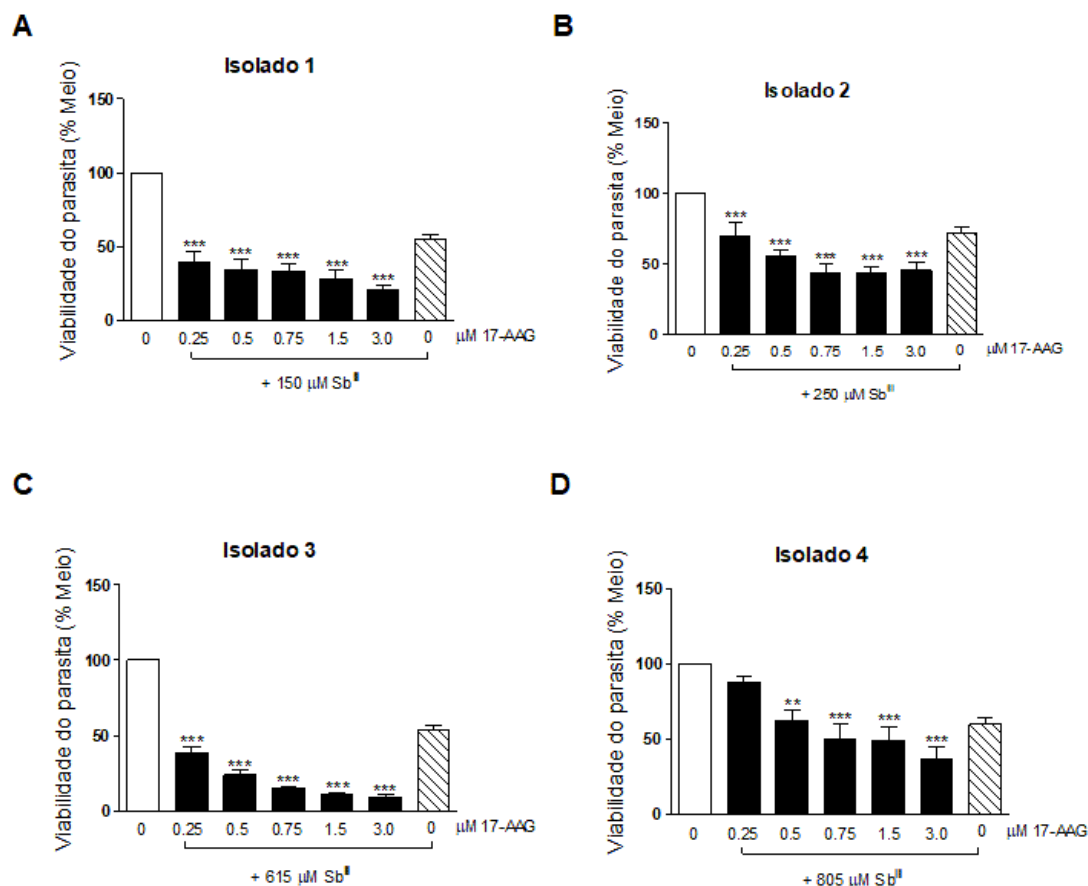


Figura 1. Associação do 17-AAG ao IC₅₀ do antimonial em culturas axênicas de isolados sensíveis e resistentes ao antimonial. Isolados sensíveis (A-B) e resistentes (C-D) ao antimonial foram expostos a crescentes concentrações de 17-AAG associadas ao IC₅₀ de cada isolado por 48 horas, quando então a viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. É possível observar um efeito dose-dependente da redução da viabilidade do [parasitaparasito](#) iniciada desde as menores concentrações testadas do 17-AAG. Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 3 experimentos realizados em triplicata.

4.2. Associação do 17-AAG ao antimonial altera o perfil de resistência de isolados de *L. infantum*

Tendo em vista que na associação entre as duas drogas houve uma melhora expressiva na redução da viabilidade das culturas, levantou-se o questionamento se o 17-AAG interfere de alguma forma na resistência dos isolados testados. Para avaliar tal característica, expôs-se tantos os isolados sensíveis quanto os resistentes a uma concentração fixa de 1μM de 17-AAG associada a crescentes concentrações do SbIII.

Dentre os isolados sensíveis ao antimonial, observa-se que o isolado 1 apresentou redução significativa de sua viabilidade quando comparada ao grupo controle

desde a concentração de 25 μ M do antimonial, a menor testada (Figura 2A). O isolado 2, por sua vez, apresentou redução da sua viabilidade de maneira significativa somente a partir da concentração de 50 μ M do antimonial (Figura 2B). Deve-se ressaltar que ambos isolados apresentaram um caráter dose dependente da redução de viabilidade frente ao aumento da concentração ao Sb³⁺ na associação das drogas.

Já quanto aos isolados resistentes ao antimonial, o isolado 3 apresentou redução significativa de sua viabilidade a partir de concentrações de 25 μ M do Sb³⁺ frente a associação das drogas (Figura 2C). No isolado 4, observou-se redução da viabilidade do parasito em concentrações a partir de 50 μ M do Sb³⁺ (Figura 2D). Além disso, ambos os isolados apresentaram um caráter dose dependente da redução da viabilidade frente a exposição as drogas. Dessa forma, é possível observar que tanto os isolados sensíveis quanto os resistentes se apresentam de forma semelhante frente a associação das drogas.

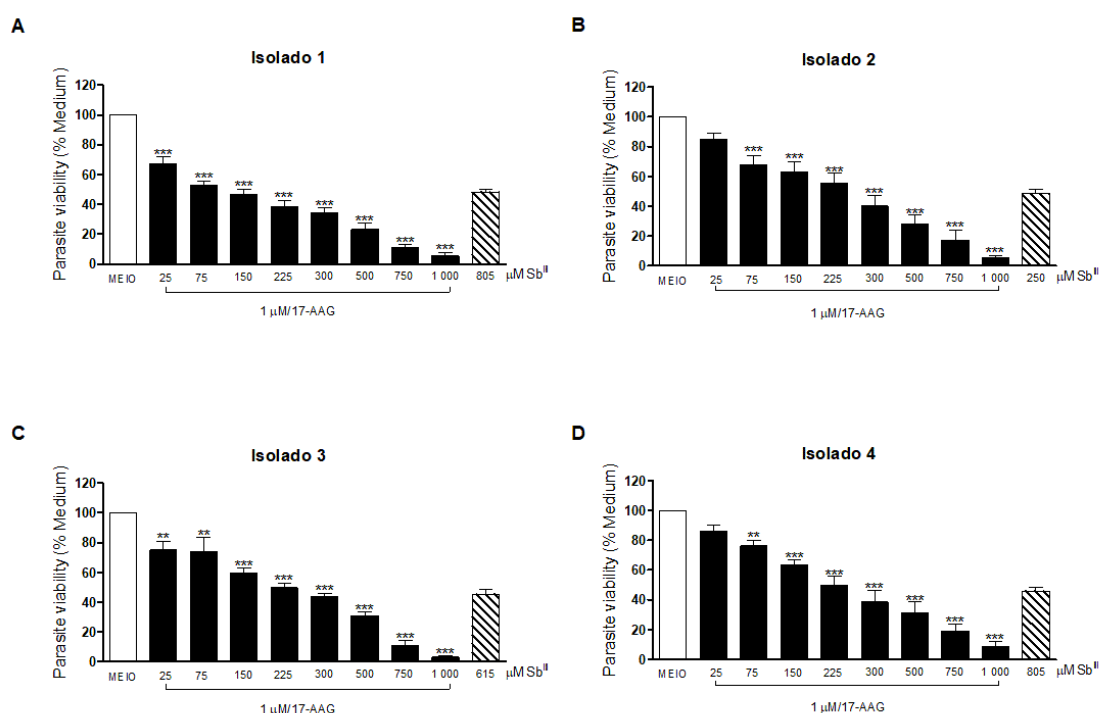


Figura 2. Associação de 1 μ M do 17-AAG a diferentes concentrações do Sb^{III} em culturas axênicas de isolados sensíveis e resistentes ao antimonial. Isolados sensíveis (A-B) e resistentes (C-D) ao antimonial foram expostos a concentração de 1 μ M do 17-AAG associado a crescentes concentrações de Sb³⁺ por 48 horas, quando então a viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. É possível observar um efeito dose-dependente da redução da viabilidade do [parasitaparasito](#) iniciada desde as menores concentrações testadas do Sb^{III}. Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 3 experimentos realizados em triplicata.

Para demonstrar que a associação com o 17-AAG torna o efeito do antimonial mais eficiente frente as culturas de isolados resistentes, expôs-se todos os isolados testados de forma isolada ao IC50 do Sb^{III} e ao do 17-AAG, além da associação entre as duas drogas (Figura 3). Nos isolados sensíveis, 1 e 2, observou-se que a associação apresentou redução significativa da viabilidade quando comparado ao grupo controle. Já nos isolados resistentes, 3 e 4, a associação apresentou redução significativa de sua viabilidade também ao se comparar com o os grupos tratados isoladamente com o Sb^{III} e com o 17-AAG. Demonstrando-se, assim, que a associação do 17-AAG ao antimonial altera o perfil de resistência dos isolados resistentes ao antimonial.

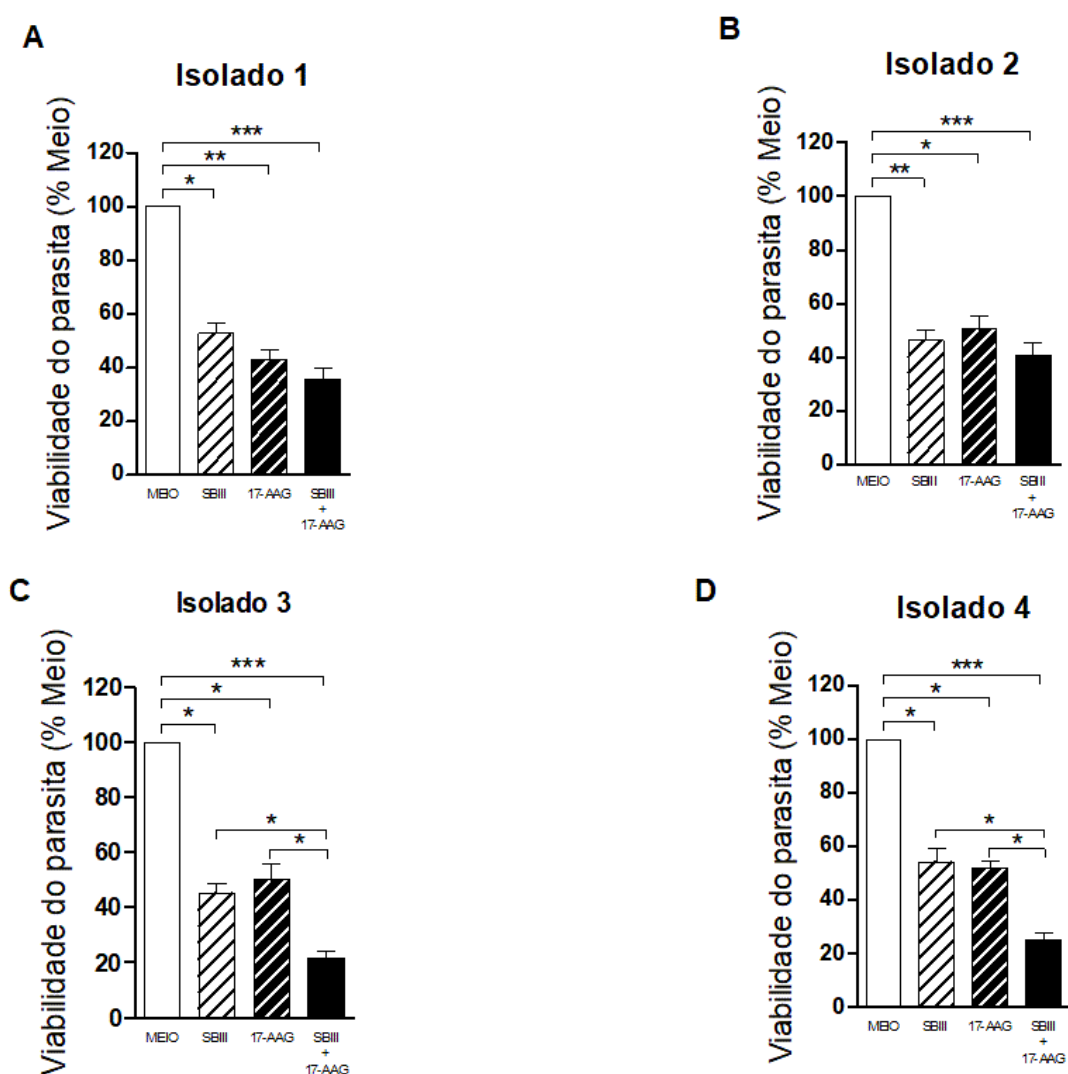


Figura 3. Associação do 17-AAG ao Sb^{III} em culturas axênicas de isolados sensíveis e resistentes ao antimonial. Isolados sensíveis (A-B) e resistentes (C-D) ao antimonial foram expostos isoladamente ao IC50 do Sb⁺³ de cada isolado, a 1uM do 17-AAG e a associação das drogas por 48 horas, quando então a viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. É possível observar

que nos isolados resistentes, a associação das drogas apresentou-se mais eficiente que todos os outros grupos testados. Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 3 experimentos realizados em triplicata.

Ao se observar que a associação entre as drogas otimiza a ação leishmanicida do antimonial, determinou-se o IC50 do Sb^{III} na associação entre as drogas de todos isolados testados (Tabela 2). Podemos observar uma redução bastante pronunciada no valor do IC50 do Sb⁺³ nos isolados considerados resistentes ao antimonial, comparáveis inclusive aos valores dos isolados sensíveis. Dessa forma, pode-se concluir que o 17-AAG, quando associado ao antimonial, é capaz de alterar o perfil de resistência ao antimonial dos isolados resistentes.

Tabela 2. Valor do IC50 do antimonial dos isolados testados na associação do 17-AAG ao Sb^{III}.

Isolado	Antimônio (μM)	Antimônio Associado (μM)
Isolado 1	150	265
Isolado 2	250	282
Isolado 3	615	266
Isolado 4	805	288

4.3. Associação do 17-AAG ao antimonial não apresenta citotoxicidade em macrófagos humanos

Em trabalhos anteriores ainda não publicados pelo grupo de pesquisa, foi demonstrado que o 17-AAG não apresenta toxicidade significativa em macrófagos humanos obtidos pelo PBMC. Diante disso, buscou-se avaliar se a associação do 17-AAG ao antimonial apresenta significativa citotoxicidade em macrófagos humanos obtidos pelo PBMC.

Macrófagos humanos foram expostos isoladamente ao Sb^V, ao 17-AAG e a associação entre as duas drogas (Figura 4). Tanto no tratamento isolado com o 17-AAG quanto na associação entre as drogas não foi observada redução da viabilidade dos macrófagos. Dessa forma, pode-se concluir que a associação do 17-AAG ao antimonial não apresenta citotoxicidade em macrófagos humanos.

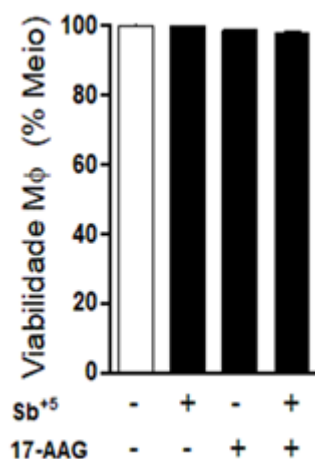


Figura 4. Citotoxicidade de macrófagos humanos tratados com a associação entre o 17-AAG e o antimônio pentavalente. Macrófagos humanos obtidos de PBMC foram expostos a 10mg de SbV, 1μM de 17-AAG e a associação entre as duas drogas por 24 horas, quando então a viabilidade foi determinada por contagem diferencial por Azul de Trypan. Nos tratamentos com o 17-AAG e com a associação das drogas foram observadas redução significativa da viabilidade dos macrófagos. O gráfico representa as médias e o erro padrão de média \pm EP de 7 experimentos independentes realizados em triplicata.

4.4. Associação do 17-AAG ao antimônio reduz a taxa de infecção por *L. infantum* em macrófagos

Tendo em vista que a associação entre o 17-AAG e o antimônio apresentou-se eficiente no tratamento de culturas axênicas de *L. infantum*, bem como apresenta baixa toxicidade em macrófagos humanos, buscou-se, então, avaliar como se comporta a associação de drogas frente a infecção de macrófagos humanos pelos isolados sensíveis e resistentes ao antimônio.

Macrófagos humanos foram infectados por um representante dos isolados sensíveis, o isolado 1, e um dos resistentes, 4, por duas horas. Após este período, as culturas foram expostas isoladamente ao Sb^V, ao 17-AAG e a associação entre as drogas por 24 horas, quando então foram coradas por H&E.

Na infecção realizada com o isolado resistente, observou-se queda de cerca 25% na quantidade de macrófagos infectados nos tratamentos com Sb^V e com 17-AAG e de 46% na associação quando comparados ao grupo controle (Figura 5A). Já no que diz respeito a taxa de infecção, constata-se redução de 14% e 25% nas culturas tratadas com Sb^V e com 17-AAG, respectivamente, e de 49% na associação quando comparada as do grupo controle (Figura 5B).

Já na infecção com o isolado sensível, observa-se queda de cerca de 31% e de 38% na quantidade de macrófagos infectados nos tratamentos com Sb^V e com 17-AAG, respectivamente, e de 52% na associação das drogas (Figura 5C). Quanto a taxa de infecção, esta apresentou redução de 57% no tratamento isolado com ambas as drogas e de 58% no tratamento com a associação das drogas.

A Figura 5E apresenta fotos representativas que confirmam a redução no número de [parasita](#) intracelulares nos grupos de macrófagos infectados tratados isoladamente com o Sb^V ou com o 17-AAG, bem como na combinação das drogas, quando comparado ao grupo controle.

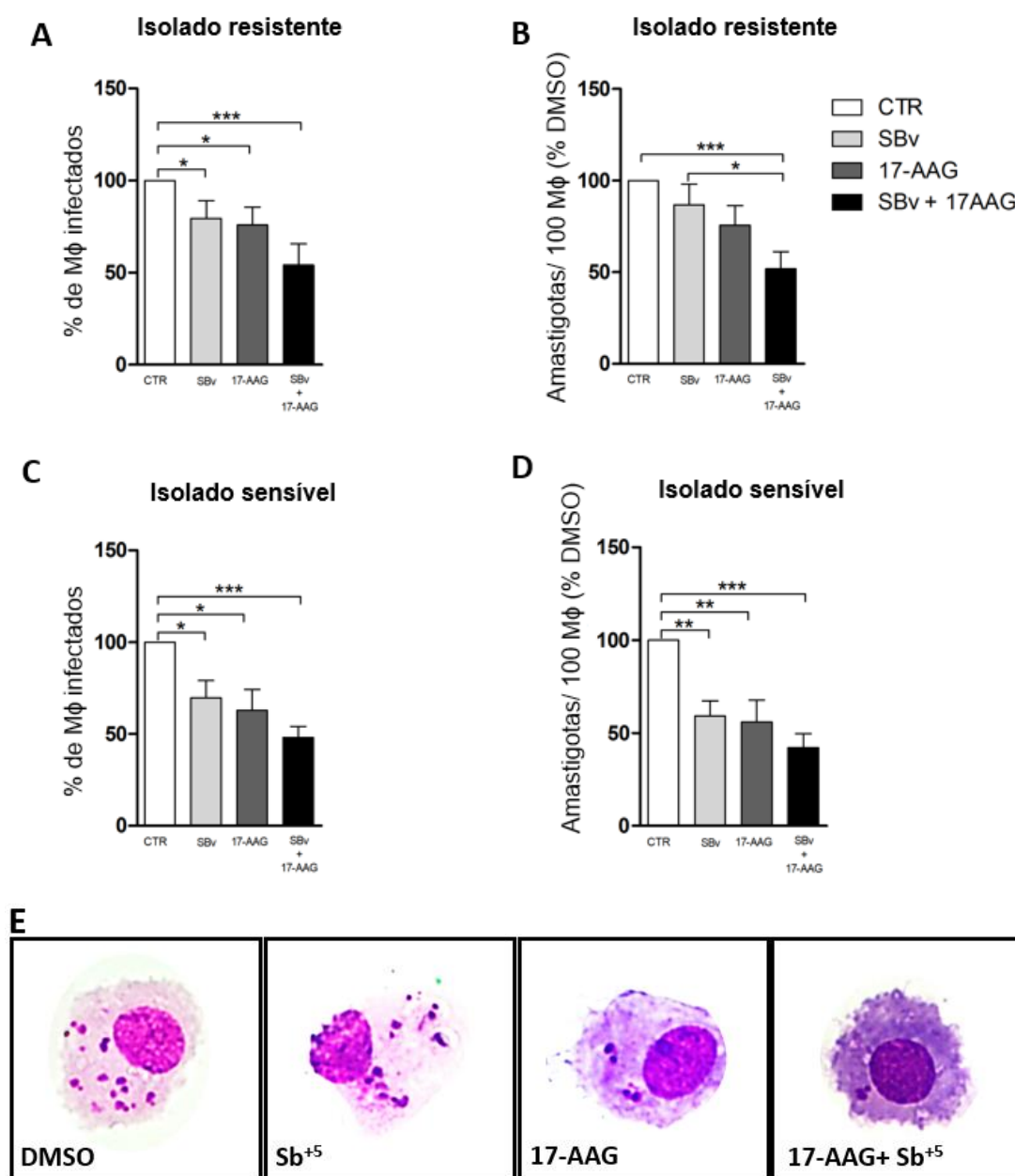


Figura 5. Associação do Sb^v ao 17-AAG no tratamento de macrófagos por isolados sensível e resistente ao antimonial. Macrófagos humanos obtidos por PBMC foram expostos aos isolados de *L. infantum* proporção de 1:10 pelo período de 2 horas, quando então as culturas foram expostas ao tratamento com 10mg de Sb^v, 1uM do 17-AAG e a associação entre as drogas por 24 horas, quando se avaliou quantidade de macrófagos infectados e a taxa de infecção por microscopia ótica. Na cultura com isolado resistente, observou-se menor número de macrófagos infectados (A) e menor taxa de infecção (B) no tratamento com a associação das drogas. Já na com o isolado sensível, observou-se também menos macrófagos infectados (C) e menor taxa de infecção na associação (D). A figura E ilustra as culturas tratadas com as diferentes combinações de drogas testadas. Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 7 experimentos realizados em duplicata.

No entanto, a contagem por microscopia ótica de lamínulas coradas por H&E apresenta limitação no que diz respeito a viabilidade parasitária, tendo em vista que não é possível realizar a diferenciação se a forma amastigota observada dentro do macrófago se encontra viável ou não. Diante disso, realizou-se, alternativamente, a cultura dos macrófagos infectados após o tratamento em meio Schneider na ausência de drogas. Sendo este meio propício para o crescimento do [parasitaparasito](#), pode-se avaliar a quantidade dos [parasitos](#)^[Rev1] que permaneceram viáveis mesmo após os tratamentos.

No que diz respeito a cultura do isolado resistente, observa-se que o grupo tratado com a associação das drogas apresentou menor crescimento ao 5º e 7º dia após a exposição quando comparado ao grupo controle. No 7º dia, os grupos que foram tratados isoladamente com o Sb^v e com o 17-AAG apresentaram 84% e 67% de viabilidade, respectivamente, enquanto o tratado com a associação das drogas, uma viabilidade de 55% (Figura 6A).

Já ~~quanto-ana~~ cultura com o isolado sensível, o grupo tratado com associação apresentou menor crescimentos aos 5º e 7º dias após a exposição quando comparado ao grupo controle, assim como observou-se na cultura com isolado resistente. No 7º dia, constatou-se viabilidade de 62% e de 48% nos grupos tratados com o Sb^v e com o 17-AAG, respectivamente, enquanto o tratado com a associação das drogas, viabilidade de 38% (Figura 6B).

Diante do exposto, pode-se constatar que, além de reduzir a infecção de macrófagos e a taxa de infecção, a associação de drogas reduz a viabilidade dos [parasitos](#) encontrados dentro dos macrófagos. Dessa forma, podemos concluir que associação do Sb^v com o 17-AAG apresenta um efeito leishmanicida irreversível tanto nos [parasitaparasitos](#) resistentes quanto nos sensíveis ao antimonial.

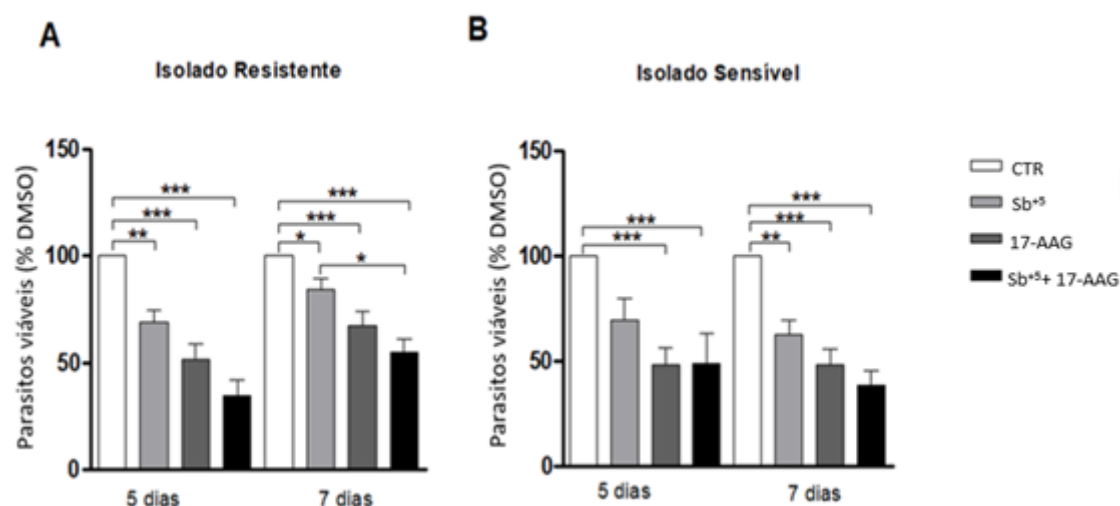


Figura 6. Avaliação da viabilidade de isolados sensível e resistente ao antimonial após o tratamento de macrófagos infectados com a associação do Sb^V e do 17-AAG. Macrófagos humanos obtidos por PBMC foram expostos aos isolados de *L. infantum* proporção de 1:10 pelo período de 2 horas, quando então as culturas foram expostas ao tratamento com 10mg de Sb^V, 1uM do 17-AAG e a associação entre as drogas por 24 horas. Após este período, fora trocado o meio das culturas para o Schneider, propiciando o crescimento dos parasitos viáveis, quando ao 5º e 7º dias após a troca do meio a viabilidade parasitária foi determinada por contagem direta em Câmara de Neubauer. O tratado com a associação de drogas apresentou menor viabilidade aos 5º e 7º tanto na cultura do isolado resistente (A) quanto na do sensível (B). Os gráficos representam as médias e o \pm EP de 7 experimentos realizados em duplicata.

5. DISCUSSÃO

O tratamento de primeira linha para a Leishmaniose Visceral corresponde a utilização de drogas antimoniais pentavalentes (Sb^V) (Chulay et al., 1988). No entanto, com o aumento no número de casos de refratariedade ao tratamento com o Sb^V , e consequente resistência dos parasitos, faz-se necessário do desenvolvimento de novas drogas para o tratamento da LV (Mishra et al, 2007).

As drogas derivadas da Geldanamicina (GA), como o 17-AAG, já são bastante utilizadas em ensaios *in vitro* e clínicos para o tratamento de neoplasias (Isaacs et al, 2013; Jhaveri et al, 2012). Já no que diz respeito a parasitoses, estudos *in vitro* e *in vivo* já demonstraram a eficiência do 17-AAG sobre os parasitos da Malária, da Doença Africana do Sono e de outras apresentações clínicas da Leishmaniose (Pallavai, 2010; Meyer & Shapiro, 2013; Petersen et al, 2012; Santos et al, 2014). Além disso, há também a presença de estudos demonstrando a aplicabilidade 17-AAG no que diz respeito a infecções pelo vírus de Chikungunya (Nayak et al, 2017).

O 17-AAG e as demais drogas derivadas da GA atuam impedindo a ligação do ATP ao seu sítio de ligação na proteína HSP90, responsável pelo enovelamento e pela estabilização de proteínas (Gupta et al, 1995; Isaacs, 2009; Schulte & Necker, 1998). Nos parasitos de *Leishmania*, a morte pelo 17-AAG é induzida ao impedir a maturação do autofagossomo e bloquear a fusão deste com o lisossomo, o que leva a autólise do parasito (Petersen et al, 2015). Além disso, o 17-AAG leva a morte do [parasitaparasito](#) através de mecanismo [desassociados](#)^[Rev2] a produção de moléculas reativas de oxigênio (ROS) (Petersen et al, 2012).

Diante do aumento nos casos de resistência ao antimonial e do potencial do 17-AAG como uma nova droga a ser acrescentada no rol das drogas para o tratamento da leishmaniose visceral, a associação de drogas apresenta-se como uma possibilidade para o tratamento da LV (Ouellete et al., 2001; Guerin et al., 2002). Dessa forma, buscou-se avaliar como se comporta a associação entre as duas drogas no tratamento *in vitro* dos parasitos causadores da LV.

Inicialmente, avaliamos o comportamento de culturas dos isolados sensíveis e resistentes ao antimonial frente a associação de diferentes concentrações do 17-AAG associado ao IC50 do Sb^{III} de cada isolado, onde observamos uma redução dose dependente da viabilidade parasitária. Quando comparado ao uso isolado do 17-AAG, obteve-se redução bastante expressiva na menor concentração a qual o efeito leishmanicida da droga passa a ser significativo (dados ainda não publicados). Além

disso, nos isolados testados no presente estudo, o uso isolado do 17-AAG no tratamento dos parasitos necessitava de concentrações altas da droga, na escala de μM , enquanto que em outros trabalhos do grupo de pesquisa que testaram o 17-AAG com outros isolados de *L. infantum* as concentrações eram na escala de nanomolares (170nM) (Petersen et al, 2012). Um comportamento semelhante com isolados testados agora só fora observado na associação do 17-AAG com o Sb^{III} , em que as concentrações do 17-AAG que reduziam a viabilidade do parasito também passaram a ser na escala de nanomolares. Desta forma, é possível sugerir a presença de um sinergismo entre o 17-AAG e o antimonial, bem como uma possível modulação no mecanismo de resistência ao antimonial.

Tendo em vista a possibilidade de o 17-AAG apresentar uma alteração no mecanismo de resistência dos isolados ao antimonial, expôs-se todos isolados testados a uma concentração fixa de 17-AAG associada a uma ~~variedade de~~ variação nas concentrações do antimonial. Nesse experimento observamos que, embora os isolados sensíveis não tenham apresentado alterações expressivas em seu comportamento frente ao antimonial, o mesmo não pode ser dito a respeito dos isolados resistentes. Estes, na associação, apresentaram redução expressiva dos valores de concentrações para reduzir a viabilidade do ~~parasita~~parasito, tendo inclusive valores de IC50 comparáveis aos dos isolados sensíveis. Dessa forma, podemos concluir que a associação do 17-AAG ao antimonial altera o perfil de resistência dos parasitos ao antimonial.

A resistência dos parasitos do gênero *Leishmania* aos antimoniais são objeto de estudo de muitos grupos de pesquisa pelo mundo. Uma das vias de resistência compreende a via dos Tióis, caracterizada também em trabalhos anteriores do grupo de pesquisa. Os ~~Tióis~~Tióis correspondem a um conjunto de moléculas antioxidantes que atuam se ligando ao antimonial, impossibilitando a ação desta droga sobre os parasitos do gênero *Leishmania* (Singh et al, 2014; Mukherjee et al, 2007; Aykin et al, 2009). Dessa forma, os parasitos considerados resistentes, apresentam níveis mais altos de Tióis quando comparados aos sensíveis (Magalhães et al., 2018).

Assim como os antimoniais, o 17-AAG apresenta vias de resistência relacionadas a via dos Tióis. Tal afirmação se ratifica pelo fato de o HSP-90, molécula alvo de ação do 17-AAG, estar ligada ao mecanismo de defesa ao estresse oxidativo no metabolismo celular, assim como os Tióis (Kim et al, 2015). Em células neoplásicas, a utilização de inibidor da via dos Tióis, o BSO, potencializou a ação do 17-AAG na redução da viabilidade das células testadas (Scarborough et al.,

2012). Além disso, outros trabalhos mostram que altos níveis de HSP-27 levam a concentrações maiores de ~~Tiols~~Tióis, que por sua vez aumentam a resistência celular ao 17-AAG (McCollum et al, 2006).

Dessa forma, por apresentarem um mecanismo de resistência em comum, é possível sugerir que a associação do 17-AAG ao antimonial potencializa a ação leishmanicida de ambas as drogas. Pode-se justificar tal afirmativa tendo em vista que, no parasito, a mesma concentração de Tiol necessária para bloquear a via de ação das duas drogas de forma isolada, agora tem que bloquear ambas ao mesmo tempo, resultando assim, numa maior concentração final efetiva de ambas as drogas. Associado a isto, o fato de o 17-AAG e o antimonial apresentarem mecanismos de ação distintos, torna ainda mais eficiente o poder leishmanicida da associação entre as duas drogas, tendo em vista que mais de uma via que leva a morte do parasito está sendo ativada ao mesmo tempo. No entanto, são necessários ainda mais estudos para que a via de ação da associação entre essas drogas possa ser devidamente caracterizada e melhor utilizada no tratamento da LV.

No entanto, apesar de associação entre o Sb^{III} e o 17-AAG se apresentar eficiente no tratamento das culturas axênicas dos isolados de *L. infantum*, apresentando inclusive redução nos valores de IC50 do Sb^{III} na associação quando comparado ao uso isolado da droga nos isolados resistentes, o mesmo não pode ser observado no tratamento dos isolados sensíveis, que apresenta, inclusive valores maiores de IC50 do Sb^{III} na associação do que quando comparado ao tratamento isolado com a droga.

Uma das vias que pode justificar tal característica apresentada pelos isolados sensíveis do presente estudo compreende a superexpressão de outra molécula de HSP a fim de manter a viabilidade do parasito (Chatterjee e Burns, 2017). É sabido que formas amastigotas de espécies do gênero *Leishmania*, quando expostas ao estresse térmico, inativam a HSP-90 e superexpressam a HSP-100 como um mecanismo compensatório (Wiesgigl e Clos, 2001). Dessa forma, acredita-se mecanismo semelhante possa estar acontecendo nos isolados sensíveis expostos a associação entre o Sb^{III} e o 17-AAG. Frente a inibição do HSP-90 pelo 17-AAG, outra molécula de HSP poderia estar sendo superexpressada, o que levaria a um aumento na produção da via dos ~~Tiols~~Tióis. Esta superexpressão, por sua vez, impediria a ação eficiente do antimonial, necessitando assim de maiores concentrações dessa droga quando comparado ao uso dela sem a associação com o 17-AAG.

A toxicidade é um dos fatores que definem a aplicabilidade de uma droga no rol de tratamento para determinadas doenças. No que diz respeito a LV, é justamente a toxicidade das drogas utilizada para o tratamento que compreende um dos principais problemas da terapia. A classe de drogas de primeira linha, os antimonais pentavalentes, (Sb^v) apresentam significativa toxicidade hepática, cardíaca e renal (Singh et al, 2014).

A exposição isolada do 17-AAG em macrófagos humanos não apresentou toxicidade significativa, como exposto no plano de trabalho anterior. Somando-se a isso, também foi observado que a associação do 17-AAG ao antimonial não levou a redução da viabilidade celular. Demonstrando assim, a manutenção do caráter não tóxico do 17-AAG nas células do sistema mononuclear fagocitário (Horibe et al., 2012). Estudos clínicos anteriores definiram a máxima concentração plasmática do 17-AAG *in vivo* como 10uM (Ramanathan et al, 2007). No entanto, trabalhos com células neoplásicas estabelecem que a concentração de 5uM do 17-AAG já apresenta toxicidade (Kamal et al, 2004; Weber et al, 2017; Schaefer et al, 2017). Dessa forma, pode-se notar que o 17-AAG age de forma seletiva sobre o HSP-90 de células neoplásicas e do parasito, sendo considerada segura para macrófagos humanos normais. Além disso, a associação de drogas apresenta-se como uma maneira eficaz de realizar o tratamento de diversas patologias, não somente da LV. Isso se justifica pelo fato de, na associação, a concentração utilizada das drogas é menor do que o uso isolado das drogas, reduzindo-se assim os efeitos colaterais a elas associados, bem como potencializa-se a terapêutica (Olliaro et al., 2010).

Tendo em vista que na associação das drogas se constata que esta é eficiente na redução da viabilidade dos isolados sensíveis e resistentes ao antimonial bem como apresenta segurança na exposição a macrófagos humanos, buscou-se avaliar então como se comporta a associação frente aos macrófagos infectados pelos parasitos. No presente estudo, constatou-se que a associação entre o Sb^v e o 17-AAG é capaz de reduzir a quantidade de macrófagos infectados e a taxa de infecção, bem como exerce um efeito irreversível no comprometimento da viabilidade dos parasitos após a exposição. Outros trabalhos também já demonstraram que a associação de drogas é um método eficaz para o tratamento da Leishmaniose. Camundongos que possuíam a forma cutânea da leishmaniose apresentaram melhor evolução da doença na associação entre o antimonial e um composto de membrana de celulose bacteriana associada ao DETC, um quelante de cobre (Celes et al, 2016). Já no tratamento da forma visceral da doença, a associação

do 17-AAG e a edelfosina sensibilizou os parasitos para melhor ação desta droga (Varela et al, 2014).

6. CONCLUSÕES

Diante de todos os dados expostos, é possível afirmar que, em ensaios *in vitro*, a associação do 17-AAG ao antimonial é eficiente para o tratamento da Leishmaniose Visceral causadas por isolados de *Leishmania infantum* resistentes ao tratamento com antimoniais, abrindo-se, assim, novas perspectivas para o tratamento desta patologia.

7. REFERÊNCIAS

AYKIN-BURNS, Nùkhet et al. Increased levels of superoxide and H₂O₂ mediate the differential susceptibility of cancer cells versus normal cells to glucose deprivation. **Biochemical Journal**, v. 418, n. 1, p. 29-37, 2009.

BAÑULS, Anne-Laure; HIDE, Mallorie; PRUGNOLLE, Franck. Leishmania and the leishmaniases: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Advances in parasitology**, v. 64, p. 1-458, 2007.

BERMAN, J. D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical infectious diseases**, v. 24, n. 4, p. 684-703, 1997.

BOAKYE, D. A.; WILSON, M. D.; KWEKU, M. A review of leishmaniasis in West Africa. **Ghana Med J**, v. 39, n. 3, p. 94-7, 2005.

BRANDAU, Sven; DRESEL, Annette; CLOS, Joachim. High constitutive levels of heat-shock proteins in human-pathogenic parasites of the genus Leishmania. **Biochemical Journal**, v. 310, n. 1, p. 225-232, 1995.

Brasil (2006) MINISTÉRIO DA SAÚDE Brasília – DF 2006. Brasilia: Ministério da Saúde. 121 p.

CAMPOS, Roseane et al. Epidemiological aspects and spatial distribution of human and canine visceral leishmaniasis in an endemic area in northeastern Brazil. **Geospatial Health**, v. 12, n. 1, 2017.

CELES, Fabiana S. et al. DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific reports**, v. 6, p. 38330, 2016.

CHATTERJEE, Suman; BURNS, Timothy F. Targeting heat shock proteins in cancer: a promising therapeutic approach. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 9, p. 1978, 2017.

CHULAY, J. D.; FLECKENSTEIN, L.; SMITH, D. H. Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 69-72, 1988.

DANTAS-TORRES, Filipe. Final comments on an interesting taxonomic dilemma: *Leishmania infantum* versus *Leishmania infantum chagasi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 8, p. 929-930, 2006.

DANTAS-TORRES, Filipe. Situação atual da epidemiologia da leishmaniose visceral em Pernambuco. **Revista de Saúde Pública**, v. 40, n. 3, p. 537-541, 2006.

DE MENEZES, Juliana Perrone Bezerra et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DE MOURA, Tatiana R. et al. Cross-resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitology research**, v. 115, n. 2, p. 713-721, 2016.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases initiative. Leishmaniasis. Disponível em: <<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl.html>>. Acesso: 02 jun. 2017

FIOCRUZ. Leishmaniose. Disponível em: <<http://www.agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acesso: 02 jun de 2017.

FREITAS-JUNIOR, Lucio H. et al. Visceral leishmaniasis treatment: what do we have, what do we need and how to deliver it?. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, v. 2, p. 11-19, 2012.

GUERIN, Philippe J. et al. Visceral leishmaniasis: current status of control, diagnosis, and treatment, and a proposed research and development agenda. **The Lancet infectious diseases**, v. 2, n. 8, p. 494-501, 2002.

GUPTA, Radhey S. Phylogenetic analysis of the 90 kD heat shock family of protein sequences and an examination of the relationship among animals, plants, and fungi species. **Molecular biology and evolution**, v. 12, n. 6, p. 1063-1073, 1995.

HANDMAN, Emanuela. Cell biology of *Leishmania*. **Advances in parasitology**, v. 44, p. 1-39, 1999.

HORIBE, Tomohisa et al. Cytotoxic activity to acute myeloid leukemia cells by Antp-TPR hybrid peptide targeting Hsp90. **Journal of bioscience and bioengineering**, v. 114, n. 1, p. 96-103, 2012.

ISAACS, Jennifer S.; XU, Wanping; NECKERS, Len. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. **Cancer cell**, v. 3, n. 3, p. 213-217, 2003.

JHAVERI, Komal et al. Advances in the clinical development of heat shock protein 90 (Hsp90) inhibitors in cancers. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 742-755, 2012.

JHAVERI, Komal et al. Heat shock protein 90 inhibitors in the treatment of cancer: current status and future directions. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 23, n. 5, p. 611-628, 2014.

KAMAL, Adeela; BURROWS, Francis J. Hsp90 inhibitors as selective anticancer drugs. **Discovery medicine**, v. 4, n. 23, p. 277-280, 2009.

KIM, Yoon Sik; SEO, Hyun Wook; JUNG, Guhung. Reactive oxygen species promote heat shock protein 90-mediated HBV capsid assembly. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 457, n. 3, p. 328-333, 2015.

LI, Qiaoli et al. Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitology research**, v. 105, n. 6, p. 1539, 2009.

MAGALHÃES, Lucas S. et al. Increased thiol levels in antimony-resistant *Leishmania infantum* isolated from treatment-refractory visceral leishmaniasis in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 119-125, 2018.

MAIA-ELKHOURY, Ana Nilce Silveira et al. Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MARCONDES, Mary; ROSSI, Claudio Nazaretian. Leishmaniose visceral no Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, p. 341-352, 2013.

MCCOLLUM, Andrea K. et al. Up-regulation of heat shock protein 27 induces resistance to 17-allylamino-demethoxygeldanamycin through a glutathione-mediated mechanism. **Cancer research**, v. 66, n. 22, p. 10967-10975, 2006.

MEYER, Kirsten J.; SHAPIRO, Theresa A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. **The Journal of infectious diseases**, v. 208, n. 3, p. 489-499, 2013.

MISHRA, Jyotsna; SAXENA, Anubha; SINGH, Sarman. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current medicinal chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153-1169, 2007.

MUKHERJEE, Angana et al. Role of ABC transporter MRPA, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, n. 2, p. 204-211, 2007.

NAYAK, Tapas K. et al. Regulation of viral replication, apoptosis and pro-inflammatory responses by 17-AAG during Chikungunya virus infection in macrophages. **Viruses**, v. 9, n. 1, p. 3, 2017.

OLLIARO, Piero L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current opinion in infectious diseases**, v. 23, n. 6, p. 595-602, 2010.

PALLAVI, Rani et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections biochemical characterization of Hsp90 from *Plasmodium falciparum* and *trypanosoma evansi* and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 37964-37975, 2010.

PETERSEN, Antonio Luis de Oliveira Almeida et al. 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing inflammatory responses in infected macrophages. **PLoS One**, v. 7, n. 11, p. e49496, 2012.

PORTAL DA SAÚDE. Coeficiente de incidência de Leishmaniose Visceral. Disponível em: <<http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2014/setembro/09/LV-Coef-Incidencia.pdf>>. Acesso: 02 jun. 2017.

RAMANATHAN, Ramesh K. et al. Phase I and pharmacodynamic study of 17-(allylamino)-17-demethoxygeldanamycin in adult patients with refractory advanced cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 13, n. 6, p. 1769-1774, 2007.

SCARBROUGH, Peter M. et al. Simultaneous inhibition of glutathione-and thioredoxin-dependent metabolism is necessary to potentiate 17AAG-induced cancer cell killing via oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 52, n. 2, p. 436-443, 2012.

SCHAEFER, Susanne; SVENSTRUP, Tina H.; GUERRA, Barbara. The small-molecule kinase inhibitor D11 counteracts 17-AAG-mediated up-regulation of HSP70 in brain cancer cells. **PloS one**, v. 12, n. 5, p. e0177706, 2017.

SCHULTE, Theodor W.; NECKERS, Leonard M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 273-279, 1998.

SINGH, Neeloo; CHATTERJEE, Mitali; SUNDAR, Shyam. The overexpression of genes of thiol metabolism contribute to drug resistance in clinical isolates of visceral leishmaniasis (kala azar) in India. **Parasites & vectors**, v. 7, n. 1, p. 596, 2014.

STANLEY, Amanda C.; ENGWERDA, Christian R. Balancing immunity and pathology in visceral leishmaniasis. **Immunology and cell biology**, v. 85, n. 2, p. 138, 2007.

SUNDAR, Shyam. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine & International Health**, v. 6, n. 11, p. 849-854, 2001.

THAKUR, C. P.; NARAYAN, S.; RANJAN, A. Epidemiological, clinical & pharmacological study of antimony-resistant visceral leishmaniasis in Bihar, India. **Indian Journal of Medical Research**, v. 120, n. 3, p. 166, 2004.

WEBER, Helga et al. Small molecule inhibitor screening identified HSP90 inhibitor 17-AAG as potential therapeutic agent for gallbladder cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 26169, 2017.

WHO. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, 2016.

WIESGIGL, Martina; CLOS, Joachim. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in *Leishmania donovani*. **Molecular biology of the cell**, v. 12, n. 11, p. 3307-3316, 2001.

ZIJLSTRA, E. E.; EL-HASSAN, A. M. Leishmaniasis in Sudan. 4. Post kala-azar dermal leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. Supplement 1, p. S59-S76, 2001.

8. ATIVIDADES REALIZADAS DE AGOSTO/17 A JULHO/18

- Revisão de literatura;
- Ensaio de sensibilidade de promastigotas a droga 17-AAG associada ao antimonial;
- Ensaio de sensibilidade de macrófagos a associação entre o 17-AAG e o antimonial;
- Ensaio de avaliação da infecção de macrófagos e da carga parasitária na associação entre o 17-AAG e o antimonial;
- Ensaio de avaliação da viabilidade dos ~~parasita~~parasitos intracelulares após a associação entre o 17-AAG e o antimonial.

9. OUTRAS ATIVIDADES

- Capacitação em atividades do laboratório;
- Participação semanal nas reuniões científicas do grupo de pesquisa;
- Cultivo de isolados de *L. infantum*;
- Manutenção e cultivo de linhagem celular;
- Determinação da concentração inibitória (IC50) para o antimonial quando associado ao 17-AAG dos isolados de pacientes refratários ao tratamento com antimonial;
- Auxiliou outros estudantes de pós-graduação do laboratório no desenvolvimento dos seus experimentos;
- Apresentação do trabalho no 27º Encontro de Iniciação Científica da UFS;
- Menção honrosa na apresentação do trabalho em pôster no III SINDIP - III Simpósio Nordestino de Doenças Infecciosas e Parasitárias;
- 2º lugar no “Prêmio Destaque” pela apresentação do trabalho no 28º Encontro de Iniciação Científica da UFS;
- 3º Lugar na apresentação do trabalho na V Semana Acadêmica-Cultural do Departamento de Medicina da Universidade Federal de Sergipe;
- Publicação de Artigo Científico em Revista de Circulação Nacional.